



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

①⑫ **Offenlegungsschrift**
①⑩ **DE 196 29 402 A 1**

②① Aktenzeichen: 196 29 402.9
②② Anmeldetag: 20. 7. 96
②③ Offenlegungstag: 5. 2. 98

⑤① Int. Cl.⁸:
A 01 H 5/00
A 01 H 1/00
C 12 N 15/82
C 12 N 15/87
C 12 P 1/00
A 01 H 1/02
B 09 C 1/00
C 02 F 3/32
// A23L 1/00, A23K
1/14

DE 196 29 402 A 1

⑦① Anmelder:
Voeste, Dirk, Dr., 44801 Bochum, DE

⑦④ Vertreter:
Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,
50667 Köln

⑦② Erfinder:
Voeste, Dirk, Dr., 44892 Bochum, DE; Barth, Stefan,
Dr., 50674 Köln, DE; Andriske, Michael, Dr., 44801
Bochum, DE; Blüm, Volker, Dr., 44797 Bochum, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:
DE 41 33 920 C1

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑤④ Verwendung von transformierten vaskulären Wasserpflanzen zur Produktion von arteigenen oder artfremden Substanzen
- ⑤⑦ Transformierte vaskuläre Wasserpflanzen erhältlich durch Transformation einer vaskulären Wasserpflanze mit genetischem Material in an sich bekannter Weise.

DE 196 29 402 A 1

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind transformierte vaskuläre Wasserpflanzen, insbesondere solche der Gattung *Wolffia*, ein Verfahren zur Transformation von vaskulären Wasserpflanzen, ein Verfahren zur Kultivierung von transformierten Wasserpflanzen, ein Verfahren zur Herstellung von Substanzen mittels der erfindungsgemäßen transformierten Wasserpflanzen, ein Verfahren zur Kreuzung von transformierten Wasserpflanzen der erfindungsgemäßen Art sowie die Verwendung der erfindungsgemäß transformierten vaskulären Wasserpflanzen.

Ein Ziel der industriellen Biotechnologie auf Basis der Molekularbiologie ist die Produktion von Substanzen, die durch Substanzen, die durch chemische Totalsynthese nur äußerst schwierig zu erhalten sind, wenn überhaupt. Dazu gehören insbesondere hochmolekulare, biologisch oder pharmakologisch wirksame Substanzen, wie beispielsweise Fette, Kohlenhydrate, Vitamine sowie Peptide oder Proteine, beispielsweise Antikörper, hochmolekulare, heterogene Konjugate und Fusionsproteine (z. B. Immuntoxine), aber auch niedermolekulare Substanzen. Durch gentechnologische Methoden können in der Regel genetisch veränderte Organismen hergestellt werden, die entweder in ihr Genom integrierte oder extrachromosomale, genetisch veränderte Information tragen. Als die üblicherweise in Betracht kommenden Systeme haben sich prokaryotische Zellen, insbesondere *E. coli*-Bakterien aber auch Hefen, die als nicht typische eukaryotische Zellen über einen komplexeren Stoffwechselapparat verfügen, etabliert.

Auch Pflanzen sind grundsätzlich genetisch veränderbar, jedoch hat sich die Pflanzen-Gentechnologie überwiegend auf die Beschleunigung von Züchtungsergebnissen konzentriert. Hierbei ist insbesondere die Einbringung von Resistenzgenen in Kulturpflanzen zu nennen, um diese Pflanzen beispielsweise gegen Krankheitserreger oder Herbizide resistent zu machen.

Pflanzen sind auch in biotechnologischen Anlagen gezüchtet worden, beispielsweise um die Biomasse dieser Pflanzen zu steigern. Dem Eingang von Pflanzen in komplexeren gentechnologischen Prozessen steht insbesondere als Hindernis entgegen, daß regelmäßig eine geringe Produktionsleistung der Stoffwechselprodukte negativ in Erscheinung tritt und Pflanzen sich regelmäßig nachteilig durch lange Generationszyklen und geringem Biomassezuwachs auszeichnen. Desweiteren ist nachteilig, daß gentechnisch veränderte Pflanzen kaum auf Akzeptanz bei Freilandversuchen stoßen. Eine Kultivierung von Pflanzen in geschlossenen Anlagen, wie beispielsweise Fermentern, ist jedoch nur äußerst selten möglich.

Nun ist es aber wünschenswert, den Synthesepapparat von Pflanzen auch der Gentechnik im engeren und weiteren Sinne zur Verfügung zu stellen, um mit Hilfe von Pflanzen komplexere Stoffwechselprodukte, insbesondere Biomoleküle, herzustellen, die sich insbesondere durch ihre Komplexität und/oder ihre Toxizität in anderen Expressionssystemen auszeichnen. Mithin besteht ein der Erfindung zugrundeliegendes technisches Problem darin, geeignete Pflanzen oder Pflanzensysteme für die Biotechnologie bereitzustellen. Die zu verwendenden Pflanzen sollen dabei in unproblematischer Weise züchtbar und der genetischen Transformation zugänglich sein.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem wird durch eine transformierte vaskuläre Wasser-

pflanze gelöst. Die Wasserpflanze ist erhältlich durch Transformation einer vaskulären Wasserpflanze mit genetischem Material, das für die gewünschte Substanz kodiert oder dessen Expression induziert und in die Wasserpflanze eingebracht werden kann. Erfindungsgemäß geeignet sind insbesondere Wasserpflanzen der Familie der Wasserlinsengewächse (*Lemnaceae*). Besonders bevorzugt ist hierbei die zur Gattung der *Wolffia* gehörende vaskuläre Wasserpflanze, besonders bevorzugt die Familie *Wolffia arrhiza*.

Die wurzellose Wasserpflanze *Wolffia arrhiza* (*L.*, Wasserlinse) gehört zu der Familie der *Lemnaceae* und gilt als die kleinste Blütenpflanze der Welt. Der Durchmesser der Blüten beträgt ca. 1 bis 1,5 mm. Die Pflanze kommt sowohl in tropischen wie auch in gemäßigten Klimabereichen vor und bildet dort auf Gewässern einen dichten "Pflanzenteppich". Neben der sexuellen Vermehrung spielt besonders die Vegetativvermehrung durch Knospung eine entscheidende Rolle für die Verbreitung dieser Art. Der hohe Biomassezuwachs, der mit *Wolffia arrhiza* verbunden ist, führt dazu, daß im asiatischen Raum in Teichen angezogene *Wolffia arrhiza* frühzeitig als Nahrungsmittel für Menschen und Tiere genutzt wurde. Für die Ernährung vorteilhaft war, daß sich der Protein- und Lipidgehalt von *Wolffia* mit den von herkömmlich angebauten Getreiden vergleichen läßt, wie Bhanthumnavin K. (1971), "Wolffia arrhiza as a possible source of inexpensive protein, *Nature* 232: 495 und Engst et al. (1991) in *Nahrung* 35: 695-710 beschrieben haben. Diese Ergebnisse verbunden mit dem kostengünstigen Anbau dieser Pflanzen führte dazu, daß die Wasserlinse als alternative Quelle für preiswertes Protein und Fett in den Mittelpunkt des Interesses rückte. So betrifft auch die DE 41 33 920 01 die Verwendung von *Lemnaceae* zur Herstellung eiweißarmer, pektinreicher zellstrukturierter Materialien mit großem Wasserbindevermögen.

In Biologie in unserer Zeit, 26. Jahrgang, 1996, Nr. 3, Seiten 187 ff. beschreiben K.-J. Appenroth und H. Augsten Wasserlinsen und ihre Nutzung.

Die Transformation der vaskulären Wasserpflanze erfolgt durch Verfahren, die es der Wasserpflanze ermöglicht, genetisches Material aufzunehmen. Es kommen hierzu insbesondere auch an sich bekannte Verfahren in Betracht. Vorzugsweise erfolgt die Transformation der vaskulären Wasserpflanzen zur Agrobacterium vermittelten Transformation, virale Infektion, Transformation nach PEG- oder Calciumchloridbehandlung, Elektroporation, Mikroinjektion, Liposomenfusion, Aufnahme freier DNA in Kokultur, Particle Bombardement, Glass-bead wounding und/oder laserinduzierte Transformation in Frage.

Die zur Transformation der Wasserpflanzen zu verwendenden Systeme sind nach dem Stand der Technik konstruierte Nukleotidstrukturen, die beispielsweise für Promotoren, Signalsequenzen, die erwünschten Zielsequenzen, Markergene und/oder ähnliche codieren. Die Expression kann verstärkt werden durch gegebenenfalls Kombination mit Silencer-, Enhancersequenzen und/oder Transkriptionsfaktoren und/oder Chaperonen, deren Expression aber auch durch Kultivierung unter definierten Bedingungen, beispielsweise unter Zusatz von Stressfaktoren (wie z. B. Hitze, Kälte, Salze, Alkohol) induziert werden kann.

Erfindungsgemäß erfolgt die Kultivierung der transformierten Wasserpflanzen in offenen oder geschlossenen Bioreaktoren. Hierbei kann in vorteilhafter Weise auch darauf zurückgegriffen werden, daß insbesondere

die Wasserlinse *Wolffia arrhiza* als Submers-Kultur gezüchtet werden kann. In einer alternativen Ausführungsform ist es jedoch auch möglich, diese Pflanzen in Aquarien, offenen oder geschlossenen Becken zu züchten. Eine etwas aufwendigere Behandlung verlangt die Anzüchtung der erfindungsgemäß transformierten Wasserpflanzen als Protoplastenkultur in wäßrigen Systemen und/oder in immobilisierter Form auf oder adsorbiert an oder auf Trägern. Sofern notwendig und möglich, kann die erfindungsgemäße transformierte Wasserpflanze auch als Kalluskultur sowie als Suspensionskultur isolierter Zellen oder auf Agar kultiviert werden. Die Auswahl der jeweiligen Kulturbedingungen richtet sich insbesondere nach den Bedürfnissen der Pflanzenkultur. Dabei kann zur Auswahl des geeigneten Kultivierungsverfahrens auch die Aufarbeitung der Pflanzen berücksichtigt werden, je nach dem, ob beispielsweise die Pflanzen die durch die Transformation zu synthetisierende Substanz in die Umgebung abgeben oder im Zellinneren akkumulieren. So kann es beispielsweise vorteilhaft sein, den durch die Transformation gebildeten Stoff in das Medium abgeben zu lassen, um dort kontinuierlich den interessierenden Stoff zu isolieren oder in der Pflanze anzureichern, um beispielsweise eine orale Applikation zu ermöglichen.

Die Kultivierung kann unterstützt werden, in dem die benötigten Nährstoffe der Wasserpflanze zugeführt werden. Dies ist in besonders vorteilhafter Weise in klassischen Zellkultursystemen aber auch in Kultursystemen, wie Fermentationsanlagen, möglich.

Vorteilhaft an der erfindungsgemäßen Verfahrensweise unter Verwendung von vaskulären Wasserpflanzen ist insbesondere die Tatsache, daß die Pflanzen sowohl sexuell, wie auch durch Protoplastenfusion gekreuzt werden können. Dies ist vorteilhaft, weil durch die freie und erleichterte Kombination rekombinanter Einzelstrukturen die Produktion komplexer Multidomän-Strukturen ermöglicht wird (Ma und Hein (1995), "Plant antibodies and immunotherapy", Plant Physiol. 109: 341-346).

Die erfindungsgemäße Verwendung von transformierten vaskulären Wasserpflanzen zur gentechnischen Herstellung von Substanzen beruht darauf, daß auch kompliziertere Moleküle durch Expression von Genen in gentechnisch veränderten Organismen zugänglich werden. So können insbesondere mit dem erfindungsgemäßen System aus transformierten Wasserpflanzen rekombinante Immunttoxine hergestellt werden. Nach PCR-Amplifikation der variablen Domänen monoklonaler Antikörper werden diese über einen synthetischen Linker miteinander verbunden. Es entsteht ein einzelsträngiges variables Fragment (scFv), das ähnliche Affinität aufweisen kann, wie der parentale Antikörper. Diese Fragmente sind durch Einsatz von bakteriophagen Systemen herstellbar und beispielsweise durch Chain Shuffling humanisierbar. Es kommt insbesondere scFv in Betracht, die an Zellstrukturen zellulärer Oberflächen binden, die möglichst ausschließlich, oder in besonders hoher Anzahl (beispielsweise an bekannten Rezeptorstrukturen: CD25, CD30, CD40, CD80, GD2 usw.) auf bestimmten Zellen zu finden sind. Die Expression biologisch-aktiver, rekombinanter Fusionsproteine in *E. coli* ist häufig problematisch, da einerseits eine starke proteolytische Degradation und andererseits eine sehr niedrig effiziente Synthese zu verzeichnen ist. Die erfindungsgemäß zu verwendenden erfindungsgemäßen transformierten Wasserpflanzen schaffen hier Abhilfe.

Patentansprüche

1. Transformierte vaskuläre Wasserpflanzen erhältlich durch Transformation einer vaskulären Wasserpflanze mit genetischem Material in an sich bekannter Weise.
2. Transformierte vaskuläre Wasserpflanze nach Anspruch 1 die zur Familie der Wasserlinsengewächse (Lemnaceae) gehört.
3. Transformierte vaskuläre Wasserpflanze nach Anspruch 2 zur Gattung der *Wolffia* gehörend.
4. Transformierte vaskuläre Wasserpflanze nach Anspruch 3, mit der Bezeichnung *Wolffia arrhiza*.
5. Verfahren zur Transformation von vaskulären Wasserpflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Wasserpflanzen nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4 transformiert werden durch ein Verfahren, das es der vaskulären Wasserpflanze ermöglicht, genetisches Material aufzunehmen.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Transformation erfolgt durch Agrobacterium vermittelte Transformation, virale Infektion, Transformation nach PEG- oder CaCl_2 -Behandlung, Elektroporation, Mikroinjektion, Liposomenfusion, Aufnahme freier DNA in Kokultur, Particle-Bombardement und/oder laserinduzierte Transformation, glass-bead wounding.
7. Verfahren zur Kultivierung von transformierten Wasserpflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 in offenen oder geschlossenen Bioreaktoren, als Submerskultur, in Aquarien, offenen oder geschlossenen Becken, als Protoplastenkultur in wäßrigen Systemen und/oder immobilisiert auf oder an Trägern, als Kalluskultur, Suspensionskultur von isolierten Zellen oder auf Agar.
8. Verfahren zur Herstellung von arteigenen und artfremden Substanzen, wobei transformierte vaskuläre Wasserpflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 kultiviert werden gemäß einem der Verfahren nach Anspruch 7.
9. Verfahren gemäß Anspruch 8 zur Isolierung von produzierten Substanzen entweder aus dem Kulturmedium oder aus den transformierten vaskulären Wasserpflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 4.
10. Verfahren zur Kreuzung von transformierten Wasserpflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei entweder eine sexuelle Kreuzung oder eine Protoplastenfusion durchgeführt wird.
11. Verwendung von transformierten vaskulären Wasserpflanzen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 zur gentechnischen Herstellung von Substanzen.
12. Verwendung gemäß Anspruch 11, wobei rekombinante Immunttoxine hergestellt werden.
13. Verwendung von transformierten vaskulären Wasserpflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 als mögliche Nahrungsquelle für Mensch und Tier.
14. Verwendung von transformierten vaskulären Wasserpflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 als als Zeigerorganismus oder Bioindikator zur Detektion von Stoffen, zum Beispiel toxischen, chemischen oder organischen Verbindungen oder Herbiziden.
15. Verwendung von transformierten vaskulären Wasserpflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Dekontamination von Böden und Gewässern (beispielsweise Verbesserung der Nitrataufnahme, Wasserregeneration).

Description

The subject of the present invention are transformed vascular aquatic plants, specifically those of the species *Wolffia*, a process for transforming vascular aquatic plants, a process for cultivating transformed aquatic plants, a process for producing substances using the inventive transformed aquatic plants, a process for hybridizing transformed aquatic plants of the inventive type, as well as the use of the vascular aquatic plants that have been transformed according to the invention.

One of the goals of industrial biotechnology on the basis of molecular biology is to produce substances, which through substances¹, which can be obtained through total chemical synthesis only with extreme difficulty, if at all. These include particularly high-molecular biologically or pharmacologically active substances, such as fats, carbohydrates, vitamins, as well as peptides or proteins, for example antibodies, high-molecular heterogeneous conjugates and fusion proteins (e.g., immunotoxins), but also low-molecular substances. Methods of genetic engineering can generally be used to produce genetically changed organisms that carry genetically changed information which is either integrated into their genome or extrachromosomal. Prokaryotic cells, specifically *E. coli* bacteria but also types of yeast, which, as non-typical eukaryotic cells have a more complex metabolism apparatus, have established themselves as the systems commonly of interest.

¹ Translator's note: The German-language sentence on which this translation is based either contains a superfluous clause, or it is incomplete.

Plants, too, can be genetically altered as a rule, however, plant gene technology has predominantly focused on the acceleration of cultivation results. The introduction of resistance genes in cultured plants may be mentioned in this context, to render these plants resistant, for example against pathogens or herbicides.

Plants have also been cultured in biotechnological systems, for example to increase the biomass of these plants. The main obstacle that is keeping plants from becoming established in more complex genetic engineering processes is the fact that a lower production output of the metabolism products regularly occurs as a negative effect and plants regularly distinguish themselves unfavorably through long generation cycles and low biomass increase. An additional shortcoming lies in the fact that plants altered through genetic engineering meet with little acceptance in field trials. Cultivating plants in closed systems, such as fermenters, however, is feasible only in extremely rare cases.

It is now desirable, however, to make the synthesis apparatus of plants available also to genetic engineering in the narrow and broader sense in order to produce, with the aid of plants, more complex metabolism products, particularly biomolecules that are characterized especially by their complexity and/or toxicity in other expression systems. One of the objects on which the invention is based thus consists of making suitable plants or plant systems available to biotechnology. The plants that are to be used must be cultivatable in an unproblematic manner and susceptible to genetic transformation.

This object on which the invention is based is met with a transformed vascular aquatic plant. The aquatic plant is obtainable through transformation of a vascular aquatic plant using genetic material, which can be codified for the desired substance or the expression of which can be

induced and introduced into the aquatic plant. Aquatic plants that are suitable according to the invention particularly include aquatic plants belonging to the family of the duckweeds (*Lemnaceae*). Particularly preferred in this context is the vascular aquatic plant belonging to the family of the *Wolffia*, particularly preferred the *Wolffia arrhiza* family.

The rootless aquatic plant *Wolffia arrhiza* (L., duckweed) belongs to the family of the *Lemnaceae* and is considered the world's smallest flowering plant. The diameter of the flowers is approximately 1 to 1.5 mm. The plant occurs both in tropical as well as in moderate climate regions, where it forms a dense "plant carpet" on waters. In addition to the sexual reproduction, it is particularly the vegetative reproduction by budding that plays a decisive role in the propagation of this species. The high biomass increase that is connected with *Wolffia arrhiza* has as a result that *Wolffia arrhiza* that is cultivated in ponds in the Asian region was utilized early-on as nourishment for humans and animals. For nourishment purposes it was advantageous that the protein and lipid content of *Wolffia* is comparable to conventionally grown crops, as described by Bhanthumnavin K. (1971) "*Wolffia arrhiza* as a possible source of inexpensive protein," *Nature* 232:495, and Engst et al. (1991) in *Nahrung* 35:695-710. These results, combined with the inexpensive cultivation of these plants resulted in duckweed becoming the focus of interest as an alternative source for inexpensive protein and fat. Patent document DE 41 33 920 01, for example, is also concerned with the use of *Lemnaceae* for the production of low-protein, high-pectin cell-structured materials with a high ability to bind water.

In *Biologie in unserer Zeit*, vol. 26, 1996, No. 3, pages 187ff, K.-J. Appenroth and H. Augsten describe duckweeds and their use.

The transformation of the vascular aquatic plant takes place by processes that permit the aquatic plant to take in genetic material. To achieve this, processes that are known per se are specifically also of interest. The transformation of the vascular aquatic plants preferably takes place to the *Agrobacterium*-induced transformation, viral infection, transformation after PEG or calcium-chloride treatment, electroporation, microinjection, liposome fusion, absorption of free DNA in coculture, particle bombardment, glass-bead wounding and/or laser-induced transformation in question.²

The systems to be used for the transformation of the aqueous plants are nucleotide structures that are constructed according to the prior art, which codify, for example, for promoters, signal sequences, the desired target sequences, marker genes and/or the like. The expression can be increased with an optional combination with silencer sequences, enhancer sequences and/or transcription factors and/or chaperones, the expression of which, however, can also be induced by means of cultivation under defined conditions, for example under addition of stress factors (such as heat, cold, salts, alcohol.)

In accordance with the invention, the cultivation of the transformed aquatic plants takes place in open or closed bioreactors. In this context, advantageous use can also be made of the fact that the duckweed *Wolffia arrhiza* in particular, can be cultivated as a submerged culture. It is also possible in an alternative embodiment, however, to cultivate these plants in aquariums, open or closed basins. A somewhat more complex treatment is required for cultivation of the inventively transformed aquatic plants as a protoplast culture in aqueous systems and/or in immobilized form on or adsorbed to or on carriers. If

² Translator's note: The German-language sentence on which this translation is based either contains a superfluous clause, or it is incomplete.

required and possible, the inventive transformed aquatic plant can also be cultured as a callus culture and also as suspension culture of isolated cells or on agar. The selection of the given culture conditions is based particularly on the requirements of the plant culture. In this context, processing of the plant may also be taken into consideration when selecting the suitable cultivation process, depending, for example, on whether the plants emit the substance to be synthesized by the transformation into the environment or whether they accumulate it in the cell's interior. It may be advantageous, for example, to have the substance that was created by the transformation emitted into the medium, in order to continually isolate the substance of interest there or to enrich it in the plant in order to permit, for example, an oral application.

The cultivation may be enhanced in such a way that the required nutrients are supplied to the aquatic plant. This is possible in a particularly advantageous manner in classic cell culture systems, but also in culture systems like fermentation systems.

A particular advantage of the inventive process under utilization of vascular aquatic plants is the fact that the plants can be hybridized both sexually as well as through protoplast fusion. This is advantageous because the free and facilitated combination of recombinant single structures enable the production of complex multi-domain structures (Ma and Hein (1995), "Plant antibodies and immunotherapy" *Plant Physiol.* 109:341-346.)

The inventive use of transformed vascular aquatic plants for the genetically engineered production of substances is based on the fact that more complicated molecules also become accessible through expression of genes in the organisms that have been transformed through genetic engineering. Particularly recombinant immunotoxins, for example, can be produced with the inventive system from transformed aquatic plants. After

PCR amplification of the variable domains of monoclonal antibodies, these are connected to one another via a synthetic linker. One obtains a single-strand variable fragment (scFv) that may have a similar affinity as the parental antibody. These fragments are producible by using bacteriophage systems and humanizable, for example through chain shuffling. Of particular interest is scFv that bind [sic] on cell structures of cellular surfaces, which are to be found preferably exclusively or in particularly high numbers (for example on known receptor structures: CD25, CD30, CD40, CD80, GD2, etc.) on certain cells. The expression of biologically active recombinant fusion proteins in *E.coli* is often problematic because a strong proteolytic degradation is often noted on one hand and a very low efficient synthesis on the other hand. This is remedied with the inventive use of the aquatic plants that have been transformed according to the invention.

What is claimed is:

1. Transformed vascular aquatic plants obtainable through transformation of a vascular aquatic plant with genetic material in a manner known *per se*.
2. A transformed vascular aquatic plant according to claim 1 that belongs to the family of the duckweeds (Lemnaceae).
3. A transformed vascular aquatic plant according to claim 2, belonging to the genus *Wolffia*.
4. A transformed vascular aquatic plant according to claim 3 with the designation *Wolffia arrhiza*.
5. A process for transformation of vascular aquatic plants according to any of claims 1 through 4, wherein the aquatic plants are transformed according to at least one of claims 1 through 4 by means of a process that permits the vascular aquatic plant to take in genetic material.
6. A process according to claim 5, wherein the transformation takes place by transformation mediated by *Agrobacterium*, viral infection, transformation after PEG or CaCl_2 treatment, electroporation, microinjection, liposome fusion, absorption of free DNA in coculture, particle bombardment and/or laser-induced transformation, glass-bead wounding.
7. A process for cultivating transformed aquatic plants according to any of claims 1 through 4 in open or closed bioreactors, as submerged culture, in aquariums, open or closed basins, as protoplast culture in aqueous systems and/or immobilized on or at carriers, as callus culture, suspension culture of isolated cells or on agar.
8. A process for production of species-specific and foreign substances, wherein transformed vascular aquatic plants are cultivated according to any of claims 1

through 4 according to one of the processes according to claim 7.

9. A process according to claim 8 for isolating produced substances either from the culture medium or from the transformed vascular aquatic plants according to any of claims 1 through 4.

10. A process for hybridizing transformed aquatic plants according to any of claims 1 through 4, wherein either a sexual hybridization or a protoplast fusion is performed.

11. The use of transformed vascular aquatic plants according to any of claims 1 through 4 for the genetically engineered production of substances.

12. The use according to claim 11, wherein recombinant immunotoxins are produced.

13. The use of transformed vascular aquatic plants according to any of claims 1 through 4 as a possible food source for humans and animals.

14. The use of transformed vascular aquatic plants according to any of claims 1 through 4 as an indicator organism or bio-indicator for detection of substances, for example toxic, chemical or organic compounds or herbicides.

15. The use of transformed vascular aquatic plants according to any of claims 1 through 4 for decontamination of soils and waters (for example improvement of nitrate absorption, water regeneration.)